



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE PSICOFARMACOLÓGICA DO**  
**EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Sargassum polyceratum* EM**  
**MODELOS ANIMAIS UTILIZANDO ROEDORES**

**ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS**

**João Pessoa - PB**

**2015**

**ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE PSICOFARMACOLÓGICA DO  
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Sargassum polyceratum* EM  
MODELOS ANIMAIS UTILIZANDO ROEDORES**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Coordenação do Curso de Graduação em  
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da  
Universidade Federal da Paraíba, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.**

**ORIENTADOR:**

**Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa**

**João Pessoa - PB**

**2015**

S237i Santos, Aline Kely Felício de Sousa.

*Investigação da atividade psicofarmacológica do extrato etanólico bruto de Sargassum polyceratum em modelos animais utilizando roedores / Aline Kely Felício de Sousa Santos. - - João Pessoa: [s.n.], 2015.*

*52f. : il.*

*Orientador: Damião Pergentino de Sousa.*

*Co-orientador: Reinaldo Nóbrega de Almeida.*

**ALINE KELY FELÍCIO DE SOUSA SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE PSICOFARMACOLÓGICA DO EXTRATO  
ETANÓLICO BRUTO DE *Sargassum polyceratum* EM MODELOS ANIMAIS  
UTILIZANDO ROEDORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Graduação em  
Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da  
Universidade Federal da Paraíba, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Bacharel em  
Farmácia.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa**  
**(Universidade Federal da Paraíba)**  
**Orientador**

---

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**  
**(Universidade Federal da Paraíba)**  
**Co-orientador**

---

**Profa. Dra. Celidarque Dias da Silva**  
**(Universidade Federal da Paraíba)**  
**Examinadora**

---

**Profa. Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori**  
**(Universidade Federal de Sergipe)**  
**Examinadora**

*A Deus, pelo fôlego de vida que me sustenta. Aos meus pais, Hailton Felício dos Santos e Lindalva de Sousa Santos, por todo amor e confiança depositados, e por sua capacidade de acreditar e investir em mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde e pela força de vontade em prosseguir esse caminho. A Ele, que foi o meu socorro bem presente nas horas de tristeza e de angústia quando a solidão tomava conta do meu ser e onde a fé era o meu sustento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, pelo acolhimento nessa reta final e pelo exemplo de pesquisador a ser seguido.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, pela confiança depositada sobre mim nesses anos de pesquisa científica, acolhendo-me calorosamente em seu laboratório de pesquisa e ajudando-me sempre que necessário.

Aos meus pais, Hailton e Lindalva, por serem o meu maior exemplo de seres humanos; por terem me dado amor, carinho e me ensinarem a trilhar os caminhos corretos. Sem vocês essa conquista seria impossível.

Aos meus irmãos, Adailton e Aldair, minha cunhada, Mirian, e meu sobrinho Kaio César, e a toda a minha família, por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Ao meu amigo, companheiro e namorado, Fernando Bernardo, por toda dedicação, apoio, compreensão e amor. Por sempre ter me incentivado na realização dos meus sonhos e por estar ao meu lado me dando forças para continuar. Amo você!

A minha tia, Elizabeth, por se comportar como uma segunda mãe, me acolhendo e me incentivando sempre.

Aos meus amigos, Ana Karine, Ovídio, Clebinho, Aline Candeia, Daiane, Nayr, Danillo, Nelson, Bruna, Priscilla, Millena, Murilo e Hyago. Vocês me proporcionaram momentos maravilhosos!

Aos meus amigos do Laboratório de Psicofarmacologia, Vanessa, Sara, Diogo, Paula, Mirian e Rubens, por tornarem o nosso ambiente o mais agradável possível e por serem essenciais na conclusão desse trabalho. Vocês são exemplos para mim!

A Profa. Dra. Mirian Salvadori, por aceitar participar desta importante etapa na minha formação e pelas contribuições a este trabalho, assim como a Profa. Dra. Celidarque Dias, pelo fornecimento da substância utilizada.

A José Crispim Duarte pelo auxílio técnico, competência e amizade, fornecidos no decorrer desta pesquisa.

Aos professores da graduação, que transmitiram seus conhecimentos e dentre os quais foi criado um elo de amizade.

Aos amigos da turma Professor Adalberto Coelho da Costa, por partilhar, durante esses cinco anos, momentos de alegria como também momentos de angústia. Levarei muitas dessas amizades para toda a vida.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e finalização desta etapa de minha vida.

Muito obrigada,

*Aline Kely Felício de Sousa Santos*

*"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez."*

*Jean Cocteau*



## RESUMO

As algas marinhas têm sido alvos de pesquisas importantes nos últimos 50 anos, nos quais foram isolados e caracterizados grande número de constituintes de grande importância para os químicos e taxonomistas. Como as informações científicas sobre *Sargassum polyceratum* é bastante limitada, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade psicofarmacológica do extrato etanólico de *Sargassum polyceratum* (SpEE). O tratamento intraperitoneal de SpEE diminuiu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina (15-30 min). A coordenação motora, avaliada no teste do rota-rod, não foi alterada nos animais tratados com SpEE em nenhuma das doses. SpEE diminuiu o tempo de lambida da pata no teste do glutamato, contudo não alterou o tempo de reação no teste da placa quente em nenhuma das doses testadas. Estes resultados indicam que o extrato etanólico de *Sargassum polyceratum* apresenta atividade antinociceptiva.

Palavras-chave: *Sargassum polyceratum*, algas marinhas, antinociceptivo.

## ABSTRACT

Marine algae has been the target of important researches in the past 50 years, in which were isolated and characterized a vast number of constituents of great importance to chemists and taxonomists. As scientific information about *Sargassum polyceratium* is quite limited, this study aims to evaluate psychopharmacological activity of ethanolic extract from *Sargassum polyceratium* (SpEE). SpEE intraperitoneal treatment reduced the number of abdominal contortions induced by acetic acid as well as the time of paw licking in the second stage of formalin test (15-30 minutes). Motor coordination, evaluated in rotarod test, has not been modified in the animals treated with SpEE in none of the doses. SpEE reduced the time of paw licking in glutamate test, however it have not altered reaction time in hot plate test in none of the tested doses. These results indicate that ethanolic extract from *Sargassum polyceratium* presents antinociceptive activity.

Keywords: *Sargassum polyceratium*, marine algae, antinociceptive.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alga parda do gênero <i>Sargassum</i> .....	20
<b>Figura 2.</b> Camundongo Swiss.....	23
<b>Figura 3.</b> Aparelho de Rota-Rod .....	24
<b>Figura 4.</b> Aparelho de placa quente .....	24
<b>Figura 5.</b> Caixa de observação para o teste da formalina .....	24
<b>Figura 6.</b> Efeito da administração do veículo e SpEE na função psicomotora avaliada no teste de Rota-Rod.....	29
<b>Figura 7.</b> Efeito da administração do SpEE e morfina na latência para a primeira contorção abdominal induzida pelo ácido acético.....	30
<b>Figura 8.</b> Efeito da administração do SpEE e morfina nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético .....	31
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração do SpEE e morfina na fase neurogênica do teste de formalina em camundongos .....	32
<b>Figura 10.</b> Efeito da administração do SpEE e morfina na fase inflamatória do teste de formalina em camundongos .....	32
<b>Figura 11.</b> Efeito do extrato etanólico de <i>Sargassum polyceratum</i> e morfina no teste da placa quente .....	33
<b>Figura 12.</b> Efeito do extrato etanólico de <i>Sargassum polyceratum</i> sobre a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\pm$	Mais ou menos
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{L/g}$	Microlitros por grama
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>E.P.M.</b>	Erro padrão da média
<b>g</b>	Gramas
<b>g/kg</b>	Gramas por quilograma
<b>h</b>	Hora
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1-beta
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>min</b>	Minuto
<b>MK-801</b>	Antagonista não-competitivo do receptor N-metil-D-aspartato
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MOR</b>	Morfina
<b>r.p.m.</b>	Rotações por minuto
<b>s</b>	Segundo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SpEE</b>	Extrato etanólico bruto de <i>Sargassum polyceratum</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Tween 80</b>	Polioxietileno sorbitano monooleato

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>16</b>
2.1. DOR - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	16
2.2. DOR - CLASSIFICAÇÃO .....	17
2.3. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS .....	19
2.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>Sargassum polyceratum</i> .....	19
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1. GERAL .....	21
3.2. ESPECÍFICOS .....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
4.1. MATERIAIS .....	22
4.1.1. Local de Pesquisa .....	22
4.1.2. Animais .....	22
4.1.3. Condições experimentais .....	23
4.1.4. Substâncias utilizadas .....	23
4.1.5. Preparação do Extrato Etanólico Bruto de <i>Sargassum polyceratum</i> .....	24
4.1.6. Aparelhagem .....	24
4.2. MÉTODOS .....	25
4.2.1. Avaliação da atividade do SpEE no Sistema Nervoso Central .....	25
4.2.1.1. Teste do Rota-rod .....	25
4.2.2. Estudo da atividade antinociceptiva do SpEE .....	25
4.2.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	25
4.2.2.2. Teste da formalina .....	26
4.2.2.3. Teste da placa quente .....	27
4.2.2.4. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato .....	27

4.2.2.5. Análise estatística .....	28
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>51</b>
Anexo A: Certidão de aprovação da Comissão Ética no Uso Animal - Centro de Biotecnologia (CEUA-CBiotec).....	51

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento e cura de enfermidades é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. Segundo Calixto (2003), estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Somente no período entre 1983-1994, das 520 novas drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais. Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. Entretanto, verifica-se que a biodiversidade brasileira (estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta), apesar de muito rica, ainda é precariamente explorada no que tange sua potencialidade, principalmente, como fonte de pesquisa para novos medicamentos.

Diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal, tais como: a necessidade da descoberta de drogas eficazes para o combate a diversas patologias crônicas; estudos sobre a biodiversidade das espécies e a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que vias alternativas mais baratas sejam oferecidas (CARVALHO, 2001). Além disso, a preservação de espécies, extração sustentável, cultivo e formas de manejo são pontos fundamentais a se considerar na pesquisa e/ou na produção industrial (MELLO, 2006).

Uma investigação nessa área influenciaria diretamente a sociedade em vários níveis, possibilitando a descoberta de novas drogas, a identificação de fontes de substâncias químicas locais capazes de substituir as importadas, assim como o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos nacionais. Para alcançar quaisquer dessas metas, entretanto, são indispensáveis à fundamentação científica. É o que possibilita a transformação segura e eficaz de uma planta em um medicamento de qualidade, diferente do uso baseado na prática popular (ELISABETSKY, 2002).

Os produtos naturais de origem marinha com atividade biológica, começaram a ser explorados de forma sistemática relativamente recente se comparados aos produtos naturais de origem terrestre. Entretanto, de forma análoga ao que aconteceu com os produtos naturais de origem terrestre – que direta ou indiretamente (através de modificação molecular ou semi-síntese) representam uma parcela significativa de todo o arsenal terapêutico disponível – os produtos de origem marinha já representam uma promissora fonte de substâncias com

finalidades terapêuticas, com alguns produtos já aprovados para uso humano (como alguns com atividade analgésica e antitumoral) e centenas de substâncias em fases variadas de ensaios clínicos. A variedade estrutural destas substâncias é surpreendente, e eles representam uma fonte ainda pouco explorada de diversidade molecular, que certamente deverá levar ao desenvolvimento de novos medicamentos como analgésicos, antitumorais, antibióticos e anti-inflamatórios (INCT AmbTropic, 2012).

As pesquisas com produtos naturais marinhos no Brasil tiveram início na década de 60 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. No entanto, ainda são poucas as informações, documentadas em artigos científicos, sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo dos 7.500 km de litoral brasileiro. As poucas informações existentes sobre a química desses organismos, muitos dos quais são espécies endêmicas, indicam um grande potencial de pesquisa para a área no Brasil. Atualmente, apenas 4 grupos de pesquisa dedicam a quase totalidade de seus trabalhos ao isolamento e identificação de produtos naturais de organismos marinhos coletados no Brasil (PINTO, 2002).

Nos últimos 50 anos cerca de 10.000 produtos naturais marinhos foram descobertos, muitos com atividade farmacológica, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcalóides, peptídeos e metabólitos de origem biossintética mista. A dificuldade de cultivo de macroorganismos marinhos ou de síntese de moléculas complexas em grande escala têm dificultado o desenvolvimento de fármacos de origem marinha. Por outro lado, várias substâncias com atividade farmacológica são suspeitas de serem produzidas por microorganismos associados, passíveis de cultura em larga escala. Isso explica, pelo menos em parte, o interesse crescente no estudo de microorganismos marinhos isolados de sedimentos, da água do mar, de macroalgas, peixes e invertebrados (PINTO, 2002).

As algas representam um dos recursos mais biologicamente ativos da natureza, pois, possuem uma riqueza de compostos bioativos primários e secundários (O'SULLIVAN *et al.*, 2010). As algas marinhas despertam a atenção da comunidade científica pelo grande potencial como produtoras de substâncias químicas de interesse industrial, econômico e médico-farmacológico, especialmente por apresentarem uma série de atividades farmacológicas descritas na literatura, como: antibacteriana (LIMA-FILHO *et al.*, 2002; FREILE-PELEGRÍN & MORALES, 2004), antitumoral (YAMAMOTO *et al.*, 1974; MAYER & HAMANN, 2005), antiangiogênica (DIAS *et al.*, 2005), hemaglutinante



(NISHINO & NAGUMO, 1991; FREITAS *et al.*, 1997) e antiviral (DAMONTE *et al.*, 1996; CARLUCCI *et al.*, 1999; ROMANOS *et al.*, 2002).

A Psicofarmacologia é a parte da farmacologia voltada para o estudo dos efeitos das drogas que atuam no sistema nervoso central, gerando alterações das funções mentais, principalmente quanto ao humor, emoções e atividade psicomotora. Boa parte dos significativos progressos obtidos por esta ciência é decorrente do trabalho integrado com outras disciplinas, como a psicologia, fisiologia, biologia molecular, morfologia, anatomia, farmacologia geral e psiquiatria, entre outras (ALMEIDA, 2006).

Segundo Almeida (2006), há milênios, são conhecidas substâncias químicas que exercem seus efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC) e que, de alguma forma, promovem modificações comportamentais, no humor ou nos aspectos emocionais, sendo hoje denominadas drogas psicoativas ou psicotrópicas, empregadas para tratar ou aliviar doenças psíquicas desde meados de 1950. Diferentes modelos animais são utilizados para investigar os efeitos de novos compostos, sejam estes sintéticos ou naturais, uma vez que correlações podem ser estabelecidas entre os efeitos clínicos e as alterações comportamentais observadas em animais, através dos modelos animais.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. DOR - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Uma das melhores definições de dor é a proposta pela IASP (*International Association for the Study of Pain* - 2012), em que a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual potencial ou real, ou descrita em termos de tal lesão”.

A dor é um sintoma presente na humanidade desde o seu início. Civilizações mesopotâmicas como os babilônicos e seus vizinhos hebreus consideravam a dor (sofrimento) como uma punição dos deuses (SANDMEL, 1976). A dor sempre foi um tópico frequente nas escritas dos antigos egípcios; evidências de uma variedade de condições dolorosas foram encontradas em exames feitos em múmias egípcias, naquela época a dor era considerada resultado de “espíritos da escuridão” que penetravam nos corpos pela boca, nariz e ouvidos (WARFIELD, 1988).

Por se tratar de uma experiência totalmente individual e subjetiva, a dor pode apresentar diferentes características como frequência, intensidade, qualidade, localização, natureza, etiologia e duração (JAMISON, 2000). Afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida e, em 10 a 40% deles, tem duração superior a um dia. Constitui a causa principal de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves consequências psicossociais e econômicas. Muitos dias de trabalho podem ser perdidos por aproximadamente 40% dos indivíduos. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado substancialmente nos últimos anos. A incidência da dor crônica no mundo oscila entre 7 e 40% da população e, como consequência da mesma, cerca de 50 a 60% dos que sofrem dela ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida (MARQUEZ, 2004).

Pressupõe-se a existência de dois componentes envolvidos no processo doloroso: um é a sensação de dor ou “nocicepção”, induzida por estímulos nocivos, que podem ser exógenos, tais como biológicos, químicos, físicos ou ainda endógenos, caracterizados principalmente por processos inflamatórios, sendo consequência da transmissão dos citados estímulos pelas vias nervosas até o córtex cerebral. O outro componente seria a reação emocional à dor, que corresponderia à interpretação afetiva a essa sensação. Esta é de caráter individual, sendo representada principalmente por experiências prévias, tais como a lembrança de alguma forma

de sofrimento. A percepção final da dor será consequência da integração de ambos os componentes (BRAUN-FILHO, 1999; BRAUN, 2004).

No século passado, a dor era considerada uma resposta sensorial inevitável à lesão tecidual. As outras dimensões da experiência dolorosa, como componente afetivo, cognitivo, diferenças genéticas, ansiedade e expectativa, eram pouco valorizadas. Nos últimos anos, grandes avanços foram feitos na compreensão dos mecanismos que são subjacentes à dor e no tratamento de pessoas que dela se queixam. (GOZANI, 2013)

## 2.2. DOR - CLASSIFICAÇÃO

A existência de muitos tipos de dor pode ser compreendida pela identificação da nocicepção, da percepção dolorosa, do sofrimento e do comportamento doloroso. A nocicepção é a detecção da lesão tecidual por transdutores especializados ligados a fibras dos nervos periféricos do tipo A delta ( $A\delta$ ) e C. A percepção dolorosa é frequentemente desencadeada por estímulo nocivo, seja uma lesão ou uma doença em tecido somático ou tecido nervoso, periférico ou central. O sofrimento é uma resposta negativa induzida por inúmeros fatores, entre os quais estão a dor, o medo, estresse e perdas. O comportamento doloroso resulta de dor e sofrimento, como posturas ou atitudes que visam diminuir o desconforto (LEMONICA 1997).

Do ponto de vista temporal, a dor é classificada como aguda e crônica e, sob a óptica da fisiopatologia, descreve-se a dor associada à nocicepção, à neuropatia (neuropática), dor referida e a dor visceral (GUSMAN, 1997).

A dor aguda é uma resposta fisiológica normal em resposta a um estímulo nocivo (CARR; GOUDAS, 1999) tais como lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas. A sensação de dor é desencadeada pela ativação de nociceptores presentes no local lesionado, normalmente sendo de curta duração e limitada a área afetada, desaparecendo com a eliminação desse estímulo nocivo (RIEDEL; NEECK, 2001).

Quando a dor aguda é muito intensa ou persiste por um período prolongado, os nociceptores podem vir a produzir um estado de hiperexcitabilidade persistente, deixando de ser aguda e passando a ser classificada como dor crônica. A dor crônica, por sua vez, persiste por um tempo maior, e está associada com processos patológicos crônicos ou decorrentes de lesões do SNC ou periférico (MERSKEY; BOGDUK, 1994; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

A dor provocada por estímulo lesivo tem a função de alertar o indivíduo e, assim, lhe permitir a possibilidade de fugir do estímulo prejudicial ou diminuir o dano que causa a sensação dolorosa. Em alguns casos, a dor persiste por tempo excessivamente longo e passa a representar sofrimento, sendo muitas vezes prejudicial ao organismo. Portanto, o primeiro caso corresponde a “dor aguda”, e o segundo, à chamada “dor crônica”. Para alguns autores, a dor crônica significa um processo patológico (dor patológica) e não tem o caráter protetor da dor aguda (dor fisiológica) (GRAEFF; GUIMARÃES, 2000).

A dor nociceptiva ocorre como o resultado da ativação de nociceptores em tecidos cutâneos e profundos. Os receptores sensoriais, preferencialmente sensíveis a estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, encontram-se na pele, músculos, tecidos conjuntivos e vísceras torácicas e abdominais. Estas unidades têm aparência morfológica bem definida à microscopia óptica e eletrônica e, fisiologicamente, caracterizam-se pelos seus padrões de reações a estímulos cutâneos, mecânicos, térmicos e químicos. Uma vez ativados, os nociceptores conduzem impulsos via fibras aferentes mielínicas finas A $\delta$ , ou pelas fibras não-mielínicas C (BRAUN-FILHO, 1999).

Dor neuropática é uma das duas principais condições dolorosas crônicas. Na dor neuropática geralmente não há nenhum dano tecidual. O que ocorre é uma disfunção das vias que transmitem dor, levando a uma transmissão crônica dos sinais dolorosos. A injúria neural que produz dor neuropática pode ser óbvia ou oculta. Ela pode ocorrer em qualquer nível das vias nociceptivas periféricas ou centrais. As injúrias periféricas sem dúvida causam alterações moleculares e anatômicas nas vias sensoriais centrais da medula, tronco, tálamo e córtex. Dor do membro fantasma que pode ocorrer após uma amputação é um exemplo (GILL; OAKLANDER, 2001).

A dor visceral é profunda, intensa, mal localizada e, frequentemente, relacionada a um ponto cutâneo, que pode ser sensível (LYNN, 1999). É o sintoma comum na maioria das síndromes dolorosas agudas e crônicas de interesse clínico. É vaga, mal localizada e se estende além do órgão lesado. Pode ser referida em regiões distantes da víscera que a originou (BRAUN, 2004). Assim, afecções pancreáticas e endometriais podem provocar dor referida nas costas; hepatoma ou metástases no fígado podem gerar dor no ombro direito; neoplasias de próstata desencadeiam dor no abdome e coxa. O mecanismo da dor referida não é totalmente compreendido, mas pode ser relacionado à convergência de impulso sensorial cutâneo e visceral em células do trato espinotalâmico na medula espinhal. A dor é relacionada à pele porque áreas encefálicas interpretam “mal” o impulso, ou porque algumas fibras aferentes inervam estruturas somáticas e viscerais (LYNN, 1999).

### 2.3. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Os fármacos atualmente utilizados já não debelam grande parte das enfermidades com eficácia. Os produtos naturais marinhos passaram a ser valorizados devido à representação de uma nova fonte de prospecção por novas drogas e pela complexidade de suas estruturas químicas distante daqueles encontrados em plantas terrestres (FAHEY *et al.*, 2001).

Os oceanos são habitados por um grande número de plantas, invertebrados marinhos e microorganismos, fontes de um grande número de produtos naturais com estruturas únicas responsáveis por funções ecológicas diferentes. Muitos desses compostos marinhos além de apresentem importância para a compreensão da evolução e manutenção das comunidades marinhas nos diferentes habitats, poderão servir como modelos estruturais para a descoberta de novos protótipos candidatos a fármacos no tratamento de doenças como antitumorais, antiviróticos e antiinflamatórios (ABRANTES, *et al.*, 2010; HARDEN, *et al.*, 2009; BHATNAGAR, *et al.*, 2010; FOLMER, *et al.*, 2010; DELLAI, *et al.*, 2010) e por essa razão o interesse das indústrias farmacêuticas no estudo de produtos naturais marinhos tem se intensificado ao longo dos últimos anos. O produto natural conotoxina isolado do molusco *Conus magnus*, anti-inflamatório neuropático, é exemplo de sucesso para a indústria farmacêutica sendo comercializado com nome comercial Prialt (Ziconotide) (KANZAK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 1987, PROKSCH, *et al.* 2002).

### 2.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Sargassum polyceratum*

A família Sargassaceae é constituída de 12 gêneros nos quais estão distribuídas cerca de 701 espécies. Essa família compreende os gêneros *Acystis*, *Anthophycus*, *Carpacanthus*, *Carpophyllum*, *Cladophyllum*, *Halochloa*, *Hizikia*, *Nizamuddinia*, *Pterocaulon*, *Sargassopsis*, *Sargassum* e *Turbinaria*, e é considerada um conjunto de algas predominantemente pardas (ENGELLEN *et al.* 2001).

O gênero *Sargassum* C. Agardh, família Sargassaceae, possui uma importância inquestionável como componente da flora marinha de regiões tropicais e subtropicais do globo. Constitui um dos mais representativos dentre os 41 gêneros da ordem Fucales, possuindo um número estimado de 485 espécies (COIMBRA, 2006). As espécies do gênero *Sargassum* se distribuem predominantemente por áreas costeiras de substrato consolidado, tanto em áreas tropicais, quanto subtropicais, frequentemente formando os chamados bancos

de *Sargassum* (SZÉCHY & PAULA, 2000). Alguns estudos recentes sugerem que os polissacarídeos, alginatos e fucoidanos, isolados de algas marinhas do gênero *Sargassum* apresentam importantes atividades biológicas, com relevância terapêutica como atividade antioxidante em células endoteliais e imunorreguladores de células NK, macrófagos e células T (CHEN *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Alga parda do gênero *Sargassum* (por Alvaro E. Migotto, Banco de Imagens Cifonauta, 2003).

*Sargassum polyceratum* é uma espécie de macroalga bentônica que está distribuída desde as águas litorâneas caribenhas do Sudoeste da Flórida até o Nordeste do Brasil (ENGELN *et al.*, 2001). *Sargassum polyceratum* é uma alga marinha ecologicamente importante, por atuar como biofiltros na diminuição da poluição do ambiente marinho, acumulando metais tóxicos, reduzindo assim, o impacto prejudicial ao ecossistema local das regiões costeiras do litoral (MURUGADAS *et al.*, 1995). A espécie *Sargassum polyceratum* também é utilizada para consumo alimentar em alguns países como Cuba onde pode ser consumida a fresco, cozida ou enlatada (ENGELN *et al.*, 2001).

Apesar de toda sua riqueza e a extensão na qual a espécie é encontrada, a literatura é escassa em relação aos produtos naturais dessa espécie, portanto sente-se a necessidade de um maior amparo científico, principalmente no que se diz respeito a psicofarmacologia, visto que não há nenhum estudo dessa espécie sobre os seus efeitos no SNC.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

- Avaliar a atividade antinociceptiva do Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratum* (SpEE), em modelos experimentais utilizando roedores.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Verificar a coordenação motora em animais tratados com o SpEE no teste do rota-rod;
- Verificar o efeito antinociceptivo do SpEE, em modelos de nocicepção química e térmica em camundongos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

#### 4.1.1. Local de Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Psicofarmacologia Elisaldo Carlini e Biotério Prof. Dr. Thomas George (BTG) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB).

#### 4.1.2. Animais

No presente estudo, foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* de linhagem *Swiss*, machos, pesando entre 25g e 35g, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George/UFPB.

Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas de polietileno, contendo 20 camundongos, sob condições monitoradas de temperatura de  $21 \pm 1^\circ \text{C}$ , tiveram livre acesso a uma dieta controlada a base de ração e água. Os animais também foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 6:00 às 18:00 horas.

Este estudo envolveu técnicas para induzir nocicepção em camundongos que foram selecionadas de acordo com a aceitação internacional e os procedimentos experimentais realizados conforme o Guia de cuidados e uso de animais de laboratório (National Academy of Sciences, 2011). Para diminuir o sofrimento dos animais foram respeitados os tempos limites de exposição do animal aos estímulos dos testes, a fim de evitar lesão tecidual (ALMEIDA, 2006). Após os testes, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, método aceito pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária conforme Resolução N° 714 de junho de 2002. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CBIotec/UFPB, sob a certidão n° 01006/13.





**Figura 2.** Camundongo Swiss (Fonte: <http://jaxmice.jax.org/strain/001803.html>).

#### **4.1.3. Condições experimentais**

O presente estudo foi desenvolvido e realizado no Laboratório de Psicofarmacologia.

No dia do experimento os animais foram separados em gaiolas de polietileno (quatro animais em cada) e levados à sala de experimentação, pelo menos 120 minutos antes da execução dos testes, com a finalidade de se adaptarem ao novo ambiente. Eles também foram privados de ração e água 60 minutos antes dos testes e mantidos à temperatura de  $21 \pm 1^\circ \text{C}$ .

As bancadas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, no entanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), a fim de minimizar odores que viessem interferir no comportamento dos animais. Todos os procedimentos experimentais aconteceram no período das 12:00 às 17:00 horas.

#### **4.1.4. Substâncias utilizadas**

- Ácido acético glacial (Reagen - Brasil);
- Água destilada (UFPB - Brasil)
- Cloridrato de morfina (Merck - E.U.A.)
- Etanol (UFPB - Brasil)
- Formaldeído 37% (Vetec - Brasil)
- Glutamato (Sigma - E.U.A.)
- MK-801 (Sigma - E.U.A.)
- SpEE (Laboratório de Fitoquímica/CBiotec/UFPB - Brasil)
- Tween 80 (Vetec - Brasil)

#### 4.1.5. Preparação da amostra do Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratum*

Foi utilizado o SpEE, preparado e cedido pela Profa. Dra. Celidarque Dias da Silva do Laboratório de Fitoquímica/UFPB, que coletou o material no litoral da cidade de João Pessoa - Paraíba/Brasil.

O SpEE foi dissolvido em Tween 80 à 2% e em água destilada, utilizando-se concentrações decimais de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10g de peso do animal.

As doses utilizadas durante os experimentos foram estabelecidas com base em teste anteriores. Foram preparadas as doses de 50, 100 e 200 mg/kg de SpEE para administração intraperitoneal (i.p.). Para o controle negativo, foi utilizado água destilada (i.p.).

As demais substâncias foram preparadas, em suas respectivas doses, alguns minutos antes de sua utilização, sendo dissolvida em água destilada e administradas por via i.p., com exceção da formalina e glutamato que foram injetadas via intraplantar.

#### 4.1.6. Aparelhagem

- Aparelho de rota-rod (Insight - Brasil) (Figura 3);
- Aparelho de placa quente (Panlab - Espanha) (Figura 4);
- Caixa de observação para o teste da formalina (Brasil) (Figura 6).



**Figura 3.** Aparelho de rota-rod (Fonte: <http://insightltda.com.br/>)



**Figura 4.** Aparelho de placa quente (Fonte: <http://www.panlab.com/>)



**Figura 5.** Caixa de observação para o teste da formalina (Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antinociceptiva.html>)

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1. Avaliação da atividade do SpEE no Sistema Nervoso Central**

#### **4.2.1.1. Teste do Rota-rod**

Este teste, descrito por Dunham e Miya (1957), avalia uma possível propriedade miorelaxante ou neurotóxica de algumas drogas com perfil depressor no SNC (DE SOUSA *et al.*, 2007). Nessa metodologia, a coordenação motora é verificada por meio da capacidade do animal em permanecer sobre uma barra giratória em intervalos de tempo pré-estabelecidos (MATTEI; FRANÇA, 2006).

Foi realizado uma pré-seleção dos animais 24 horas antes do experimento. Nesta pré-seleção não há a administração de quaisquer substâncias, e são excluídos aqueles animais que não conseguirem permanecer sobre a barra giratória (girando a 7 r.p.m.) por, pelo menos, um minuto em três tentativas.

No dia do experimento, os animais selecionados foram divididos em 5 grupos (n=8) e tratados com veículo, SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) ou diazepam (4 mg/kg, i.p.), uma hora antes da realização do teste. O tempo de permanência de cada camundongo sobre a barra giratória foi cronometrado por um período máximo de 3 minutos e as observações foram feitas após 30, 60 e 120 minutos dos tratamentos iniciais.

### **4.2.2. Estudo da atividade antinociceptiva do SpEE**

#### **4.2.2.1. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Este teste baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal do ácido acético a 1% provoca irritação dos tecidos dessa área envolvendo a estimulação de nociceptores, gerando reações comportamentais, sendo tal efeito nociceptivo caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959). Essa contorção acontece em virtude da ativação de canais de cátions não-seletivos em neurônios nociceptivos periféricos, como também na liberação de vários mediadores inflamatórios.

Esse método é bastante comum na triagem de substâncias com potencial efeito antinociceptivo, no entanto não apresenta especificidade, visto que diversos tipos de drogas são efetivos nesse modelo, tais como anticonvulsivantes, anticolinérgicas e anti-histamínicas (STEPANOVIC-PETROVIC *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2010).

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=8) nos quais receberam veículo, SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) ou morfina (6 mg/kg, i.p.) como controle positivo. Após 30 min dos tratamentos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ácido acético 1% (10µL/g de peso). O número de contorções abdominais foi contabilizado por um período de 10 min para cada animal.

#### **4.2.2.2. Teste da formalina**

O teste da formalina foi realizado como descrito por HUNSKAAR e HOLE (1985) em camundongos. Este teste é considerado um modelo de dor persistente e em sua metodologia uma solução de formalina é injetada na região intraplantar do camundongo o que causa a estimulação de nociceptores, tendo o tempo de lambida da pata como indicação de resposta nociceptiva (SOUZA *et al.*, 2000). O experimento é considerado um modelo bifásico de comportamentos de dor. A primeira fase (Fase neurogênica) ocorre após cerca de 5 minutos e, é resultante da estimulação direta dos nociceptores; a inibição desta fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam a nível central. Em seguida, há um período de “descanso” (interfase) que dura aproximadamente 10 minutos e resulta de uma ativação de mecanismos inibitórios da dor. Na sequência, ocorre uma segunda fase (Fase inflamatória) com duração de 15 minutos, gerada tanto pela estimulação dos nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios, encontrando a medula espinhal num estado de hiperexcitabilidade, induzida pela fase neurogênica. Além de analgésicos centrais os anti-inflamatórios podem atuar na fase inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

O procedimento foi realizado de acordo com Hunskaar and Hole (1987) com algumas modificações. Após trinta minutos dos tratamentos com veículo, SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.), a formalina (20µL, 2.5%) foi administrada por via intraplantar na pata posterior direita. O tempo total de lambida da pata foi registrada nas duas fases descritas após a injeção da formalina.

#### 4.2.2.3. Teste da placa quente

Este teste, descrito por Eddy e Leimback (1953), representa uma modificação do modelo original de Woolfe e MacDonalds (1944). Consiste em quantificar o tempo que o animal permanece sobre uma superfície metálica previamente aquecida a  $56 \pm 1^\circ \text{C}$ . O tempo em segundos que o animal leva para lambear, levantar ou morder uma das patas é cronometrado e considerado como um indicativo de dor, já que são respostas nociceptivas integradas supraespinhalmente (YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI; CHIBA, 2002). Esse evento é caracterizado por uma ativação dos nociceptores (fibras C e A $\delta$ ) que conduzem o impulso nervoso ao corno dorsal da medula espinhal e aos centros corticais (DICKENSON; BESSON, 1997).

Os animais são submetidos a uma pré-seleção, sem administração de quaisquer substâncias, onde serão considerados aptos aqueles que obtiverem um tempo de resposta a dor inferior a 10 segundos, quando colocado sobre a placa quente.

Os camundongos foram individualmente colocados sobre a placa aquecida após 30, 60 e 120 min dos tratamentos com veículo, SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.). O parâmetro registrado foi a latência para lambida, mordida ou o levantar da pata posterior, ou pular. O tempo máximo foi definido como 15 segundos para evitar lesão tecidual.

#### 4.2.2.4. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

O papel do sistema glutamatérgico foi investigado como descrito por Beirith *et al.*, 2002. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão de sinais nociceptivos (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

Com a finalidade de avaliar a influência do sistema glutamatérgico sobre a atividade antinociceptiva, os animais foram divididos em 5 grupos (n=8) e tratados (i.p.) com veículo, SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (0.03 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção intraplantar de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de glutamato (30  $\mu\text{mol}$ ) na pata posterior direita. Imediatamente após a injeção do agente flogístico os camundongos foram individualmente observados, na caixa de observação para o teste de formalina (Figura 5), por um período de 15

minutos. Foi considerado como uma resposta nociceptiva o tempo que o animal permanecer lambendo a pata que foi injetada com glutamato.

#### **4.2.2.5. Análise estatística**

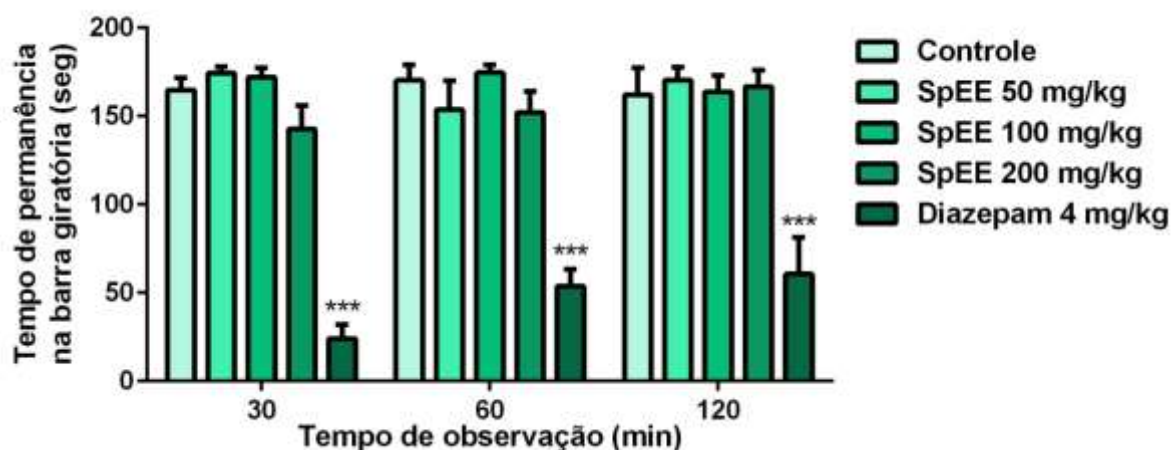
Os resultados foram analisados utilizando o método de Análise de Variância (ANOVA) “*one-way*” seguido do teste de Dunnett para comparação entre as médias. Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. (erro padrão da média), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância ( $p$ ) menor que 0,05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO SpEE NO SNC

#### 5.1.1. Efeito do SpEE no teste do Rota-Rod

Nesta metodologia, não foram observadas alterações significantes na coordenação motora dos camundongos tratados com SpEE nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, após a avaliação da capacidade do animal em permanecer sobre a barra giratória nos tempos de 60, 120 e 180 minutos dos tratamentos iniciais, quando comparados ao grupo controle no mesmo período de avaliação. O diazepam (4 mg/kg) diminuiu a resposta comportamental em todos os tempos avaliados. (Figura 6)



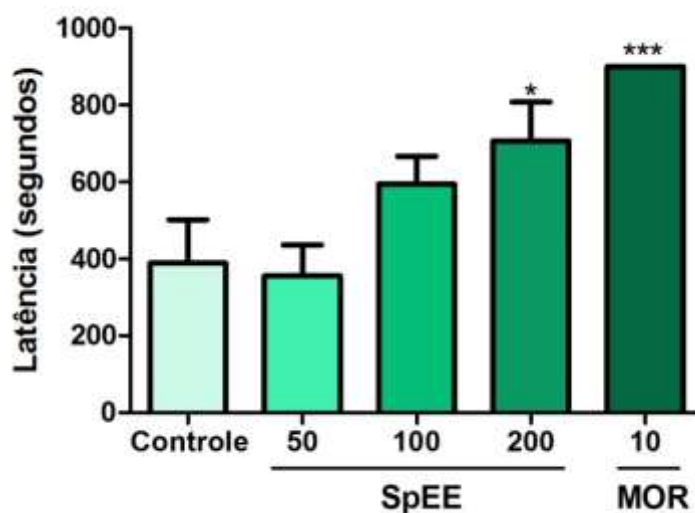
**Figura 6.** Efeito da administração do veículo (grupo controle) e SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) na função psicomotora avaliada no teste de Rota-Rod. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). \*\*\*p<0,001 versus grupo controle.

## 5.2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO SpEE

### 5.2.1. Efeito do SpEE no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

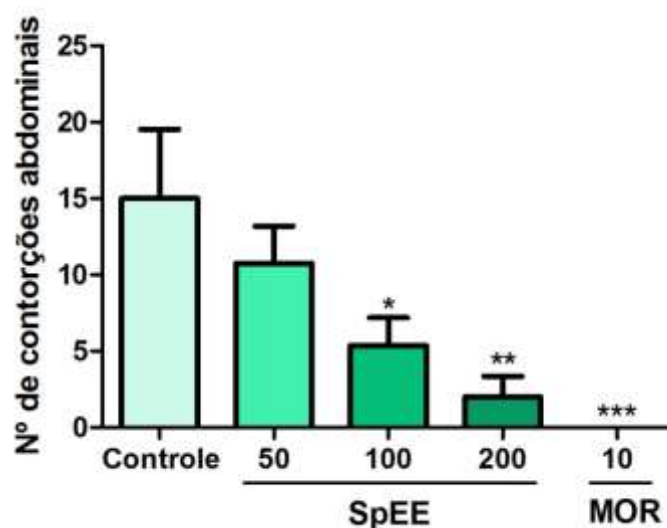
A Figura 7 representa os resultados obtidos do tratamento dos animais com SpEE nas doses de 50 mg/kg ( $355,1 \pm 80,86$  s), 100 mg/kg ( $594,9 \pm 72,16$  s) ou 200 mg/kg ( $707,4 \pm 100,5$  s) e os grupos padrão morfina (10 mg/kg) ( $900,0 \pm 0,0$  s). Verifica-se que estes tratamentos aumentaram significativamente a latência para o início das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, quando comparados ao grupo controle ( $388,8 \pm 113,7$  s).

Na Figura 8 é apresentado o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, os animais tratados com as doses do SpEE, apresentaram uma redução significativa do número de contorções abdominais nas doses de 100 ( $5,3 \pm 1,8$ ) e 200 mg/kg ( $2,0 \pm 1,3$ ), não observando esse efeito significativo na dose de 50 ( $10,7 \pm 2,4$ ), quando comparados ao grupo controle ( $15,0 \pm 4,5$ ). Como esperado, a morfina [(10 mg/kg i.p.) ( $0,0 \pm 0,0$ )] produziu uma inibição das contorções abdominais de 100%.



**Figura 7.** Efeito da administração do SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg) na latência para a primeira contorção abdominal induzida pelo ácido acético. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  versus grupo controle.



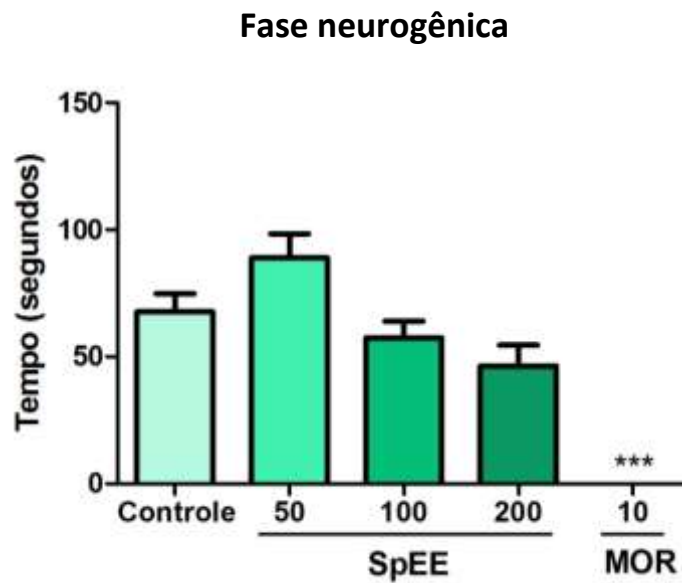


**Figura 8.** Efeito da administração do SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg) nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  versus grupo controle.

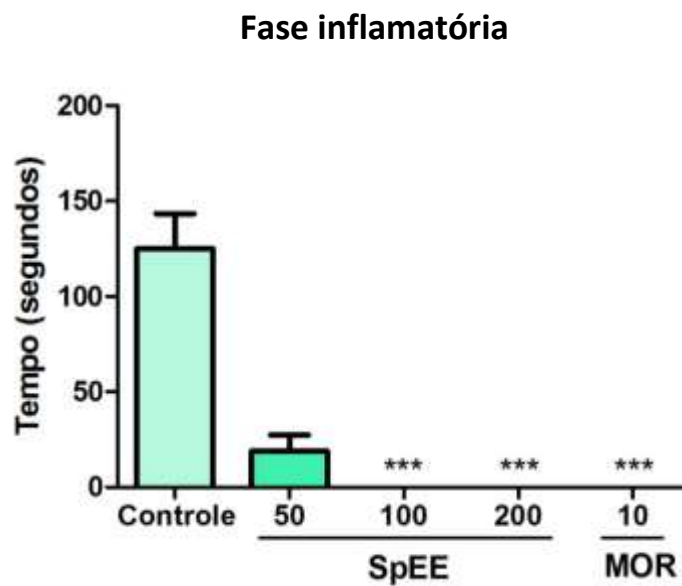
### 5.3. Efeito do SpEE no teste da formalina

Os resultados obtidos durante a fase neurogênica do teste da formalina podem ser observados na Fig 9. O tratamento com SpEE nas três doses diferentes 50 mg/kg ( $88,8 \pm 9,6$  s), 100 mg/kg ( $57,4 \pm 6,7$  s) e 200 mg/kg ( $46,4 \pm 8,2$  s) não reduziram o tempo de lambida da pata na fase neurogênica (0 - 5 min), quando comparados ao grupo controle ( $67,6 \pm 7,2$ ). Somente o grupo morfina (10 mg/kg) ( $0,0 \pm 0,0$  s) apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle.

Na fase inflamatória do teste da formalina (Fig. 10), apenas as doses de 100 mg/kg ( $0,0 \pm 0,0$  s) e 200 mg/kg ( $0,0 \pm 0,0$  s) do SpEE apresentaram reduções significativas do tempo de lambida da pata em relação ao grupo controle ( $125,2 \pm 18,2$  s). O grupo tratado com a morfina (10 mg/kg) ( $0,0 \pm 0,0$  s) também reduziu o tempo de lambida da pata.



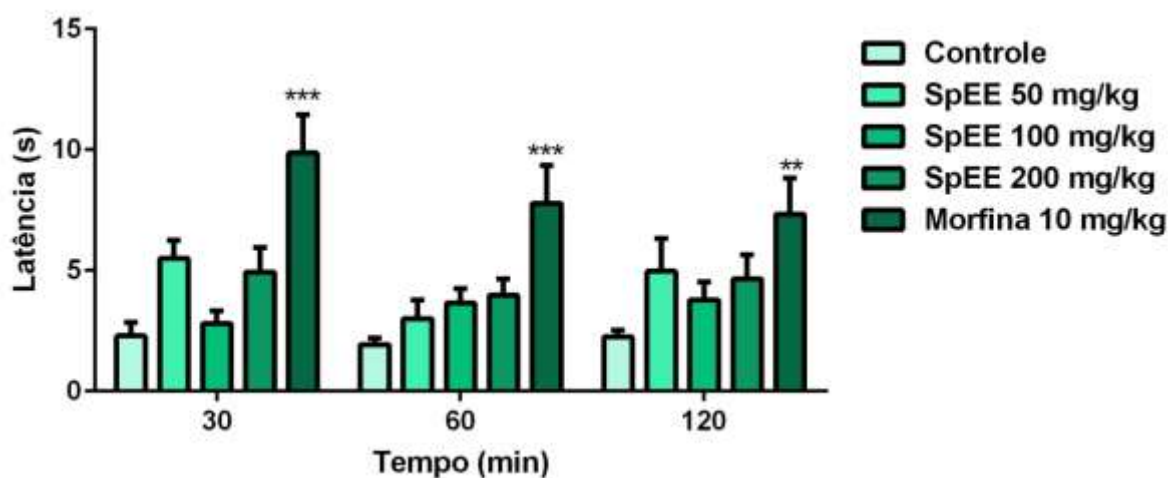
**Figura 9.** Efeito da administração do SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg) na fase neurogênica do teste de formalina em camundongos. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). \*\*\*p<0,001 versus grupo controle.



**Figura 10.** Efeito da administração do SpEE (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg) na fase inflamatória do teste de formalina em camundongos. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). \*\*\*p<0,001 versus grupo controle.

#### 5.4. Efeito do SpEE no teste da placa quente

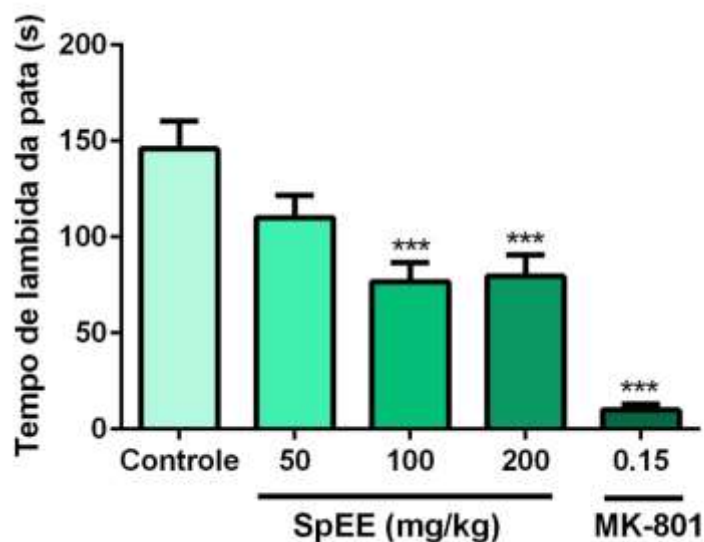
Segundo a figura 11, o SpEE não foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo nociceptivo provocado pela placa quente em nenhum dos tempos testados. O pré-tratamento com morfina (10 mg/kg, i.p.) aumentou o tempo de permanência do animal no aparelho nos tempos de 30 ( $9,9 \pm 1,6$  s), 60 ( $7,8 \pm 1,6$  s) e 120 ( $7,3 \pm 1,5$  s) minutos da administração, quando comparadas ao grupo controle ( $2,3 \pm 0,6$  s,  $1,9 \pm 0,3$  s,  $2,2 \pm 0,3$  s).



**Figura 11.** Efeito do extrato etanólico de *Sargassum polyceratum* (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) no teste da placa quente. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). \*\*\*p<0.001 versus grupo controle.

### 5.5. Efeito do SpEE no teste da nocicepção induzida por glutamato

Avaliando a possível participação do sistema glutamatérgico periférico, os resultados apresentados mostram que o SpEE nas doses de 100 e 200 mg/kg reduziram significativamente ( $76,8 \pm 9,8$  s;  $79,6 \pm 11,1$  s, respectivamente) a nocicepção induzida por glutamato, comparando-se com o grupo controle negativo ( $145,9 \pm 14,5$  s) (Figura 12). Similarmente, o grupo controle positivo tratado com MK-801, antagonista do receptor glutamatérgico do subtipo NMDA, também demonstrou redução significativa ( $9,9 \pm 3,0$  s) do tempo de lambida da pata dos animais.



**Figura 12.** Efeito do extrato etanólico de *Sargassum polyceratum* sobre a nocicepção induzida pelo glutamato ( $20 \mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. ( $n=8$ ) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). \*\*\* $p<0.001$  versus grupo controle.

## 6. DISCUSSÃO

O tratamento da dor tem sido motivo de vários estudos. O uso de plantas e seus derivados com finalidades terapêuticas têm ocorrido de forma extensiva e crescente em todo o mundo, conforme dados obtidos junto ao mercado farmacêutico e às altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos, observados na última década. Os produtos naturais marinhos passaram a ser valorizados devido à representação de uma nova fonte de prospecção por novas drogas e pela complexidade de suas estruturas químicas distante daqueles encontrados em plantas terrestres (SOUZA *et al.*, 2012).

Os estudos dos efeitos psicofarmacológicos realizados com o Extrato Etanólico Bruto de *Sargassum polyceratum* (SpEE) compreenderam inicialmente uma observação geral das alterações psicomotoras em camundongos. O teste do *Rota-Rod*, consiste em avaliar a coordenação motora dos animais, através do tempo total de permanência destes em uma barra giratória. A falta de coordenação motora no teste do *Rota-Rod* é uma característica de agentes farmacológicos, como os relaxantes musculares esqueléticos ou de drogas que diminuem a atividade do SNC, tais como neurolépticos, ansiolíticos, sedativos e hipnóticos (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006). A avaliação da função motora, após um tratamento, é importante, para não gerar resultados falso-positivos nos modelos animais de nocicepção, uma vez que distúrbios na atividade locomotora do animal podem levar a conclusões errôneas, tais como efeito “pseudo-antinociceptivo” (YOKORO *et al.*, 2001; RABOISSON; DALLEL, 2004; WILHELM *et al.*, 2009).

Todas as doses testadas do SpEE no teste do *Rota-Rod* não afetaram a coordenação motora dos animais tratados, descartando assim um efeito relaxante muscular ou mesmo uma neurotoxicidade, que é comum a algumas drogas com perfil depressor do SNC. A atividade antinociceptiva do SpEE foi avaliada por modelos de nocicepção químico (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste da nocicepção induzida por glutamato) e térmico (teste da placa quente).

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um modelo clássico de nocicepção inflamatória visceral que provoca uma irritação no peritônio, caracterizada pela contração abdominal e pelo alongamento das patas traseiras (COLLIER *et al.*, 1968). É um teste amplamente utilizado na triagem de drogas com potencial analgésico, por ser um teste de execução simples, rápido, com resultados confiáveis devido a sua alta sensibilidade a drogas de ação central e periférica (AMARAL *et al.*, 2007). Porém, este teste apresenta baixa especificidade, isto é, drogas com diferentes mecanismos de ação podem

obter êxito nesse teste, pois é sensível tanto aos opióides quanto a outras substâncias como anti-inflamatórios não esteroidais e anticonvulsivantes (SANTOS *et al.*, 2010).

Esse comportamento nociceptivo é resultado dos prótons oriundos da dissociação do ácido acético e podem ativar diretamente canais de cátions não seletivos localizados nas fibras aferentes primárias conhecidos como canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC) (JULIUS; BASBAUM, 2001), ou indiretamente, por promover a estimulação e liberação de mediadores inflamatórios, tais como produtos da biossíntese da prostaglandina, aminas simpatomiméticas, bradicinina, substância P e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8) (COLLIER *et al.*, 1968; IKEDA *et al.*, 2001), entre outros, que se ligam a receptores metabotrópicos, ativando uma cascata de sinalização de segundos mensageiros (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001), estimulando neurônios aferentes primários a aumentar a liberação de glutamato no fluido cerebrospinal (FENG; CUI; WILLIS, 2003).

Os resultados obtidos, durante esta etapa, sugerem que o SpEE produziu uma inibição da nocicepção em camundongos por reduzir significativamente o número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, em relação ao controle. Os resultados também mostram que a morfina (analgésico central) que atua em receptores opioidérgicos, causou uma inibição das contorções abdominais de 100%.

Embora o SpEE mostre um efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético, este teste isolado é incapaz de afirmar se a antinocicepção foi central ou periférica. Por isso, o teste da formalina foi realizado, com o objetivo de caracterizar de forma mais precisa a atividade antinociceptiva exibida por este extrato.

O teste da formalina, que consiste num modelo bifásico de nocicepção, usado para avaliar o mecanismo pelo qual um animal responde a uma nocicepção contínua (BHANDARE *et al.*, 2010). Neste teste, uma injeção de formalina na pata traseira do animal provoca injúria tecidual que resulta em comportamentos relacionados com a dor no animal, como o de lambê-lo ou morder a pata injetada com uma solução de formalina (ZARRINDAST; NASSIRI-RAD; PAZOUKI, 1999; LEE; JEONG, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2007). Neste modelo é possível avaliar de forma contínua como um animal reage à nocicepção que é gerada pelo tecido lesado.

Este teste é marcado pela fase neurogênica que se inicia imediatamente após a injeção da formalina com duração de apenas cinco minutos. O mecanismo de ação nociceptiva na primeira fase do teste, que tem início imediatamente após a administração de formalina, caracteriza-se pela excitação direta das fibras C sensoriais, através da ativação de receptores TRPA1 (MCNAMARA *et al.*, 2007). Relata-se também que mediadores como substância P e

bradicinina participam deste mecanismo neurogênico (PARADA *et al.*, 2001). Drogas que atuam em nível central (opioides) são os principais agentes a atuarem nesta fase neurogênica da nocicepção (FERREIRA *et al.*, 2006). Então, há uma interfase de, aproximadamente, 10 minutos, na qual há uma redução da atividade nociceptiva pela ativação dos mecanismos homeostáticos de antinocicepção. Em seguida, ocorre a fase inflamatória (15-30 min), que parece ser causada por alterações teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e pode ser acompanhada pela liberação de histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, óxido nítrico, fator de necrose tumoral  $\alpha$  e interleucinas. Drogas de ação periférica como os anti-inflamatórios (não esteroidais ou corticosteróides), somente são eficazes nesta segunda fase (SALVADORI, 2013).

A fase inflamatória origina-se de mecanismos periféricos e também da ativação de neurônios centrais sensibilizados devido à inflamação periférica, como também da ativação de neurônios aferentes primários, não podendo ser interpretada como consequência da fase neurogênica (COELHO *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2009).

O extrato em estudo demonstrou atividade apenas na fase inflamatória do teste da formalina. Este achado sugere que possivelmente o SpEE tem pronunciada ação anti-inflamatória, visto que nas doses de 100 e 200 mg/kg promoveu redução do tempo de lambida da pata dos animais na fase de inibição da dor periférica.

No intuito de discriminar a atividade antinociceptiva central e periférica, avaliou-se o efeito de SpEE no teste da placa quente. O teste da placa quente avalia substâncias com possível ação analgésica central. A placa aquecida à temperatura constante provoca respostas comportamentais, como lambida da pata ou movimento de pular (NEMIROVSKY *et al.*, 2001; ORLANDI *et al.*, 2011). O estímulo térmico promove ativação dos nociceptores (A $\delta$  e C) que levam o impulso para o corno dorsal da medula espinhal e aos centros corticais em que são interpretados (DICKENSON; BESSON, 1997). SpEE não alterou a latência ao estímulo nociceptivo no teste da placa quente em nenhuma das doses testadas, portanto, este resultado sugere que a antinocicepção mediada pelo SpEE deve-se a mecanismos de ação periféricos e não de ação central.

O glutamato é o neurotransmissor excitatório predominante no sistema nervoso central e periférico, sendo liberado em resposta à nocicepção, inflamação ou dano tecidual (YASHPAL *et al.*, 2001). Este aminoácido excitatório pode contribuir para o desenvolvimento de quadros dolorosos ao atuar em fibras aferentes de pequeno diâmetro nas terminações periféricas. A administração de glutamato intraplantar promove nocicepção pelo estímulo de receptores glutamatérgicos em sítios periféricos, medulares e supra-medulares e esta ação pode ser ou

não mediada por mecanismos envolvendo receptores N-metil-D-aspartato (BEIRITH *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2011; SAKURADA *et al.*, 2003).

Os resultados com o SpEE corroboram sua eficácia já vista no teste do ácido acético e teste da formalina, uma vez que as doses de 100 e 200 mg/kg, para esta metodologia, promoveram inibição da nocicepção, assim como o que foi visto no trabalho de Moniruzzaman (2015) com o extrato etanólico de *Hedyotis corymbosa* Linn. Sugere-se, então, que possivelmente o SpEE atua via sistema glutamatérgico para promover antinocicepção.

Em suma, esses resultados demonstram a atividade antinociceptiva, que ocorre via mecanismos anti-inflamatórios, do SpEE em modelos experimentais, contribuindo para o conhecimento científico desse extrato. Portanto, faz-se necessários estudos adicionais para aprofundar e elucidar seu mecanismo molecular de ação.



## 7. CONCLUSÕES

Conforme os resultados apresentados neste trabalho obtidos a partir das metodologias utilizadas em camundongos, foi possível concluir que o SpEE:

- Induz alterações comportamentais no SNC, sem causar alteração motora;
- Promove antinocicepção nos modelos de nocicepção química (teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, nocicepção induzida por glutamato e no teste da formalina), mas não no modelo de nocicepção térmica (teste da placa quente);

## REFERÊNCIAS

ABRANTES JL, BARBOSA J, CAVALCANTI D, PEREIRA RC, FREDERICO FONTES CL, TEIXEIRA VL, MORENO SOUZA TL, PAIXÃO IC. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyotapaffii* and *Dictyotamenstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Medica**, 76 (4):339-44, 2010

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 357p.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, p.40-56, 2004.

AMARAL, J.F.; SILVA, M.I.G.; NETO, M.R.A.; NETO, P.F.T.; MOURA, B.A.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; DE SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, P.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.1217-1220, 2007.

ARAÚJO, F.L.O.; MELO, C.T.V.; ROCHA, N.F.M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J. C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v.380, p.337-344, 2009.

AZEVEDO, A.O.; CAMPO, J.J.; GALDINO, G.S.; BRAGA, F.C.; DUARTE, I.D. G.; PEREZ, A.C. Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.354-356, 2007.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw o edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v.924, n.2, p.219-228, 2002.

- BHANDARE, A.M.; KSHIRSAGAR, A.D.; VYAWAHARE, N.S.; HADAMBAR, A.A.; THORVE, V.S. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.3412–3417, 2010.
- BHATNAGAR I, KIM SK. Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies., **Marine Drugs**, 15;8(10):2702-20, 2010.
- BRAUN, L. Dor aguda. **Dor, Diagnóstico & Tratamento**, v. 1, p. 3-14, 2004.
- BRAUN-FILHO, J. L. Conceituação de dor. **Prática Hospitalar**, v. 1, p. 31-33, 1999.
- CALIXTO, J. B. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Ciência e Cultura**, v. 55, nº3, 2003.
- CARLUCCI, M.J., CIANCIA, M., MATULEWICZ, M.C., CEREZO, A.S., DAMONTE, E.B., 1999. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Research**, 43, 93-102.
- CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **The Lancet**, v.353, p.2051-2058, 1999.
- CARVALHO, J. E. Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M. **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas**, v. 2. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, 2001, p.196-202.
- CHEN, H., KUANG, W., SHI, F. Protective and repairing effects of *Sargassum fusiforme* polysaccharides on oxidative injured vascular endothelial cells *in vitro*. **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v.42, p.829-831, 2007.
- COELHO, L.P.; REIS, P.A.; CASTRO, F.L.; GAYER, C.R.M.; LOPES, C.S.; SILVA, M.C.C.; SABINO, K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G.P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.109-116, 2005.

COIMBRA, C. S. **Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Agardh do Atlântico Sul.** São Paulo. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2006.

COLLIER, H.O.J., DINNEEN, L.C., JOHNSON, C.A., SCHNEIDER, C., 1968. The Abdominal Constriction Response and its Suppression by Analgesic Drugs in the Mouse. **British Journal Pharmacology**, v.32, p.295-310.

DAMONTE E.B., MATULEWICZ M.C., CEREZO, A.S., COTO, C.E., 1996. Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the Red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Chemotherapy**, v.42, p.57-64.

DELLAI A., MARICIC I., KUMAR V., ARUTYUNYAN S., BOURAOUI A., NEFZI A. Parallel synthesis and anti-inflammatory activity of cyclic peptides cyclosquamosin D and Met-cherimolacyclopeptide B and their analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 1;20 (19):5653-7, 2010.

DE SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F. ; ALMEIDA, R. N. ; CLAUDINO, F. S. ; MATTEI, R. ; LEITE, J. R. Pharmacological effects of the monoterpene alpha, beta-epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007.

DIAS, P.F., SIQUEIRA, J.M. JR., VENDRUSCOLO, L.F., DE JESUS NEIVA, T., GAGLIARDI, A.R., MARASCHIN, M., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M., 2005. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.56, p.436-446.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: BESSON, M.J.; Dickenson, A. **The pharmacology of pain**, Springer-Verlag, Berlim. p.21-41, 1997.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.46, p.208-209, 1957.

- EDDY, N.B.; LEIMBACK, D.J. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and diethienylbutylamines. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.107, p.385-393, 1953.
- ELISABETSKY, E. Fitoterapia com base científica. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 182, p. 78-79, 2002.
- ENGELN, A.E., OLSEN, J.L., BREEMAN, A.M., STAM, W.T. Genetic differentiation in *Sargassum polyceratum* (Fucales: Phaeoecae) around the island of Curaçao (Netherlands Antilles). **Marine Biology**, v.139, p.267-277, 2001.
- FAHEY, J. W., ZALCMANN, A. T., TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, 56: 5–51, 2001.
- FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid–induced visceral nociception. **Anesthesiology**, v.98, p.729-733, 2003.
- FERREIRA, A. A., AMARAL, F. A., DUARTE, I. D. G., OLIVEIRA, P. M., ALVES, R. B., SILVEIRA, D., AZEVEDO, A. O., RASLAN, D. S., CASTRO, M. S. A. Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. **J. Ethnopharmacology**, v.105, p.148-153, 2006.
- FOLMER F, JASPARS M, SCHUMACHER M, DICATO M, DIEDERICH M. Marine natural products targeting phospholipases A2. **Biochemical Pharmacology**, 15;80(12):1793-800, 2010.
- FREILE-PELEGRÍN, Y., MORALES, J. L., 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. **Botanica Marina**, v.47, p.140-146.
- FREITAS, A., TEXEIRA, D.I.A., COSTA, F.H.F., FARIAS, W.R.L., LOBATO, A.S.C., SAMPAIO, A.H., BENEVIDES, M.B., 1997. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.495-501.
- GILL, S. J.; OAKLANDER, A. L., 2001. **The Neurologist**, v. 7, p. 263-269.

GOZZANI, J. L. Fisiopatologia da Dor. IN: CAVALCANTE, I. L., MADDALENA, M. L. (Org.). **Dor**. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, p.13-36, 2003.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2000, 260p.

GUSMAN, A. C.; COSTA D. C, BASTOS, J. C, MAGALHÃES, K. S, MAIA, L. R, PENA, M. G. M. A dor e o controle do sofrimento. **Revista de Psicofisiologia**, v. 1(1), p. 1-26, 1997.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 11. ed., p. 1008, 2006.

HARDEN EA, FALSHAW R, CARNACHAN SM, KERN ER, PRICHARD MN. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, 83(3):282-9, 2009.

HUANG, G.J.; HUANG, S.S.;LIN, S.S.;SHAO, Y.Y.;CHEN, C.C.;HOU, W.C.;KUO, Y.H. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of ergostatrien-3beta-ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.12, p.7445-7452, 2010.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 143, p. 769-775, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

IASP (International Association for the Study of Pain) Subcommittee on taxonomy. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definition of pain terms. **Pain** (Suppl 3), 2009.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OHISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v.69, p.2911-2919, 2001.

BIOPROSPECÇÃO de produtos naturais de origem marinha. INCT AmbTropic (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais), 2012. Disponível em: < <http://www.inctambtropic.org/grupos-de-trabalho/plataforma-continental--/bioprospeccao-de-produtos.html>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

JAMISON R. N. M.; KAUFFMAN, J.; KATZ, N. P. Characteristics of Methadone Maintenance Patients with Chronic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 19, p. 53- 62, 2000.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-210, 2001.

KANZAKI, A.; TAKEBAYASHI, Y.; REN, X. Q.; MIYASHITA, H.; MORI, S.; AKIYAMA, S.; POMMIER, Y.; **Molecular Cancer Therapeutics**, 1, 1327, 2002.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412 -414, 1959.

LEE, I.O.; JEONG, Y.S. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. **Journal of Korean Medical Science**, v.17, p.81-85, 2002.

LEMONICA, L. **Aspectos Psicossociais da Dor**. Âmbito Hospitalar, v. 7, p. 27-28, 1997.

LIMA-FILHO, J.V.M., CARVALHO, A.F.F.U., FREITAS, S.M., MELO, V.M.M., 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33,311-314.

LYNN, B. The detection of injury and tissue damage. In: WALL PD, MELZACKR (eds): **Textbook of Pain**, Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 19 – 33, 1999.

MCNAMARA, C. R., MANDEL-BREHM, J., BAUTISTA, D. M., SIEMENS, J., DERANIAN, K. L., ZHAO, M., HAYWARD, N. J., CHONG, J. A., JULIUS, D., MORAN, M. M., FANGER, C. M. 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U S A. 104, 13525-13530.

MARQUEZ, J. O. **Bases de anatomia e fisiologia**. Dor, Diagnóstico & Tratamento, v. 1, p. 3-10, 2004.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 12, p. 138-142.

MAYER, A.M., HAMANN, M.T., 2005. Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.140, p.265-286.

MELLO, J. C. P. ***Croton moritibensis*: avaliação farmacognóstica, cromatográfica e biológica in vitro e in vivo**. 2006. 67 f. Projeto de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, **IASP Press**, p.210. 1994.

MILLER, K. E., HOFFMAN, E. M., SUTHARSHAN, M., SCHECHTER, R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, v.130, p.283–309, 2011.

MONIRUZZAMAN, MD., FERDOUS, A., IRIN, S. Evaluation of antinociceptive effect of ethanol extract of *Hedyotis corymbosa* Linn. Whole plant in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.161, p.82-85, 2015.



MURUGADAS, T.L., PHANG, S.M., TONG, S.L. Heavy metal accumulation cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, Bull. Tokyo v.39, p.2129–2131, 1995.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V.; JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinalmorphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia& Analgesia**, v.93, p.197-203, 2001.

NISHINO, T., NAGUMO, T. Change in the anticoagulant activity and composition of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* during refrigerated storage of the fronds. **Botanica Marina**, v.34, p.387-390, 1991.

PARADA, C. A., TAMBELI, C. H., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102, p.937–944, 2001.

OLIVEIRA, B. M.; CRUZ, L. J.; DE SANTOS, V.; LE CHEMINANT, G. W.; GRIFFIN, D.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J. M.; GALYEAN, R.; VARGA, J.; GRAY, W. R.; RIVIER, J.; **Biochemistry**, v.26, p.2086, 1987.

ORLANDI, L.; VILELA, F.C.; SANTA-CECÍLIA, F.V.; DIAS, D.F.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.1469-1476, 2011.

O'SULLIVAN, L., MURPHY, B., MCLOUGHLIN, P., DUGGAN, P., LAWLOR, P.G., HUGHES, H., GARDINER, G.E. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. **Marine Drugs**, v.8, p.2038-2064, 2010.

PINTO, A. C.; BOLZANI, D. C.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p.45-61, 2002.

PROKSCH, P., EDRADA, R. A., EBEL, R. Drugs from the seas – Current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Technology**, v.59: p.125-134, 2002.

PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v. 78, p. 1720-1721, 2006.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.28, p.219-226, 2004.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v.60, p.404-415, 2001.

ROMANOS M., ANDRADA-SERPA, M.J., DOS S., RIBEIRO, A., YONESHIGUE-VALENTIN, Y., COSTA, S.S., WIGG, M.D. Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation in vitro. **Cancer Investigation**, v.20, p.46-54, 2002.

SAKURADA, T., MATSUMURA, T., MORIYAMA, T., SAKURADA, C., UENO, S., SAKURADA, S. Differential effects of intraplantar capsaizine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.75, p.115–121, 2003.

SALVADORI, M. G. S. S.; **Mecanismo De Ação Da Atividade Antinociceptiva E Anti-Inflamatória Do (-) - Mirtenol**, 2013. p. 21, p. 28. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SANDMEL, S. editor: **The New English Bible**, Oxford University Press. New York, Oxford University Press, 1976.

SANTOS, D.A.; FUKUI, M.D.E.J.; DHAMMIKA NANAYAKKARA, N.P.; KHAN, S.I.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F.; DA SILVA FILHO, A.A.; QUINTÃO, N.L. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.543-550, 2010.

SOUZA, G. H. B., MELO, J. C. P., LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. 1ed. Ouro Preto, UFOP, 2012.

SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85-90, 2000.

STEPANOVIC-PETROVIC, R.M.;TOMIC, M.A.;VUCKOVIC, S.M.;PARANOS, S.;UGRESIC, N.D.;PROSTRAN, M.S.;MILOVANOVIC, S.;BOSKOVIC, B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesthesia & Analgesia**, v.106, p. 1897-903, 2008.

SZÉCHY, M. T. M., PAULA, É. J., 2000. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, p.121-132.

VILELA-FILHO, O. Dor: Anatomia funcional, classificação e fisiopatologia. **Jovem Médico**, v. 2, p. 125- 132, 1998.

WARFIELD, C. A. A history of pain relief. **Hospital Practice**, v. 23, p. 121-122, 1988.

WILHELM, E.A.; JESSE, C.R.; BORTOLATTO, C.F.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO, L. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.93, p. 419-425, 2009.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, p.1765-1769, 2000.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.80, p.300-307, 1944.

YAMAMOTO, I., NAGUMO, T., YAGI, K., TOMINAGA, H., AOKI, M. Antitumor effect of seaweeds. I. Antitumor effect of extracts from Sargassum and Laminaria. **The Japanese journal of experimental medicine**, v.44, p.543-546, 1974.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N.; CHIBA, T. Analgesic effect of intrathecally administred Teredorexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. **British Journal Pharmacology**, v.137, p.170-176, 2002.

YASHPAL, K., FISHER, K., CHABOT, J.G., CODERRE, T.J. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. **Pain**, 94, 17–29, 2001.

YOKORO, C.M.; PESQUERO, S.M.; TURCHETTI-MAIA, R.M.; FRANCISCHI, J.N.; TATSUO, M.A. Acute Phenobarbital administration induces hyperalgesia: pharmacological evidence for the involvement of supraspinal GABA-A receptors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.397-405, 2001.

ZARRINDAST, M. R.; NASSIRI-RAD, S.; PAZOUKI, M. Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. **General Pharmacology**, v.32, p.517-522, 1999.

## ANEXO

### Anexo A: Certidão de aprovação da Comissão Ética no Uso Animal (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIDÃO

João Pessoa, 22 de novembro de 2013.

CEUA Nº 1006/13

Ilmo(s). Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Departamento Departamento de Fisiologia e Patologia - CCS - UFPB

Orientando(s): Aline Kelly Felício de Sousa Santos, (Iniciação Científica)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 22/11/2013 analisou e APROVOU a execução do projeto INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE PSICOFARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS, FRACÇÕES E SUBSTÂNCIAS DE ORGANISMOS MARINHOS EM MODELOS ANIMAIS UTILIZANDO ROEDORES..

Com previsão de empregar 400 Camundongos SWISS Machos - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de 01/08/2013 a 31/07/2014

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBIotec  
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba  
<https://pba.ufrpb.br/site/ceua/cbiotec/> – [ceua@cbiotec.ufpb.br](mailto:ceua@cbiotec.ufpb.br)